

Aus der Kinderklinik
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. med. K. Stehr

Glutathion Peroxidase und Selen im Blut
von Früh- und Neugeborenen sowie Säuglingen
bis zum Alter von einem Jahr

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Eva Maas-Doyle
aus Nürnberg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546215_0001

Aus der Kinderklinik
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. med. K. Stehr

Glutathion Peroxidase und Selen im Blut von Früh- und Neugeborenen sowie Säuglingen bis zum Alter von einem Jahr

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Eva Maas-Doyle
aus Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten

Referent: Priv.-Doz. Dr. H. Böhles

Korreferent: Prof. Dr. K. Stehr

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.1980

Inhaltsangabe

	Seite
Einführung	1
Fragestellung	7
Untersuchungsgut	8
Bestimmung der Aktivität der Glutathion Peroxidase	9
- Reagenzien	10
- Durchführung	13
- Ansätze	13
Bestimmung der erythrozytären Selenkonzentration	15
- Reagenzien	15
- Apparatur	17
- Durchführung	18
- Auswertung	22
Ergebnistabellen	23
Diskussion	
- der Glutathion Peroxidase Aktivität	30
- der Selenkonzentration	33
Zusammenfassung	36
Literaturverzeichnis	37
Anlage	
- Protokoll der Enzymaktivitätsbestimmung	44
- Ablaufdiagramm für die Selenbestimmung	46

Liste der Abbildungen und Tabellen

	Seite
Abbildung 1: Mechanismen des Membranschutzes	4
Tabelle 1: Neugeborene mit Geburtsgewicht $\leq 2000\text{g}$	23
Tabelle 2: Neugeborene mit Geburtsgewicht $> 2000\text{g}$	24
Tabelle 3: Altersgruppe 1 Monat	25
Tabelle 4: Altersgruppe 2 Monate	26
Tabelle 5: Altersgruppe 4 Monate	27
Tabelle 6: Altersgruppe 6 Monate	28
Tabelle 7: Altersgruppe 12 Monate	29
Abbildung 2: Glutathion Peroxidase Aktivität der Erythrozyten im Verlauf des ersten Lebensjahres	31
Abbildung 3: Selenkonzentration der Erythrozyten im Verlauf des ersten Lebensjahres	34

Glutathion Peroxidase und Selen im Blut von Früh- und Neugeborenen sowie Säuglingen bis zum Alter von einem Jahr

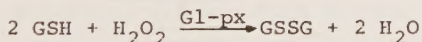
Einführung

Bereits im Jahre 1957 zeigten Fütterungsversuche an Ratten, daß 0,1 ppm Selen in der Nahrung die ernährungsbedingte Lebernekrose bei Ratten mit Vitamin E Mangel gänzlich verhindert (33). Diese Tatsache wurde im Lauf der Jahre von anderen Autoren bestätigt (9, 26, 34). Scott (36,37) fand daraufhin, daß Hühner, an die Selen verfüttert wird, eine hohe Aktivität der Glutathion Peroxidase aufweisen, wohingegen bei Hühnern, die kein Selen erhalten, die Glutathion Peroxidase Aktivität so stark abfällt, daß die Tiere an exsudativer Diathese erkranken. Auch bei anderen Tieren führt Selenmangel zu deutlichen Symptomen: bei Mäusen zu multiplen Organdegenerationen, bei Rindern, Schafen und Pferden zu Muskeldystrophie. Primaten leiden an Alopecie, Gewichtsverlust, degenerativen Veränderungen von Leber, Pankreas und Niere und sterben unter dem Bild einer Kachexie (18, 24). Beim Menschen sind keine Selenmangelsymptome beschrieben, bei Überdosierung kommt es zu Störungen der Atmungsorgane (12). Die Hauptquelle für die Selenaufnahme des Menschen sind natürliche Proteine (Fleisch, Fisch und Getreide); der tägliche Selenbedarf zur Verhinderung von Mangelerscheinungen ist allerdings nicht bekannt (19). Anorganisches Selen selbst ist ein schwaches Oxydant mit deutlichem Glutathion Peroxidase Charakter (3, 17).

Im Jahre 1973 fand Flohe et al (14) in bovinen Erythrozyten pro Mol Glutathion Peroxidase vier Gramatom Selen, was von Rotruck et al (29) bereits vorher vermutet worden war. Bei Zugrundlage eines Molekulargewichtes von 84000 Dalton entspricht einem Atom Selen je eine Untereinheit des Enzyms Glutathion Peroxidase. Im Zuge der Evolution wurden Spurenelemente in Enzymkomplexe eingebaut, was - z.B. beim Eisen im Porphyrinring des Hämoglobins - eine Aktivitätserhöhung dieses Spurenelementes bedeutet. Ebenso wird die oxidierende Wirkung von Selen durch Einbau in die Glutathion Peroxidase verstärkt (3). Diese Entdeckung, so Flohe (14), kann viele Erscheinungen des Selenmangels erklären. Da die meisten Symptome des Selenmangels auf die Peroxidation ungesättigter Fettsäuren in den Membranen zurückzuführen sind, ist die Rolle der Glutathion Peroxidase in einem Schutzmechanismus der Membranen vor diesen Peroxiden zu sehen. Somit könnte der antioxidative Effekt von Selen in der Nahrung sehr wohl der Tatsache zugeschrieben werden, daß Selen Komponente der Glutathion Peroxidase ist. Ein indirekter Beweis dafür sind die in-vitro Untersuchungen mit Mikrosomen von Hühnern, die verschiedene Diäten erhalten hatten (35). Aus der Arbeit von Smith et al (39) geht hervor, daß die Glutathion Peroxidase Aktivität proportional dem Selengehalt in der Nahrung ansteigt. Vilas et al bestätigen dies in ihrer Untersuchung der Magenschleimhaut von Ratten (43). Sie fanden, daß bei Selenzufuhr die Glutathion Peroxidase Aktivität ansteigt und bei Selenmangel abfällt. Die gleiche Beobachtung machten Noguchi et al (25) bei Hühnern. Die Korrelation zwischen diätetischer Selenzufuhr und Glutathion Peroxidase Aktivität beim Menschen wird durch Arbeiten von Rudolph (30) und Lombeck (18) bestätigt.

Der erste Nachweis von Glutathion Peroxidase in Erythrozyten erfolgte 1957 durch (21). Die Entgiftung von Wasserstoffperoxid ist im wesentlichen von diesem Enzym abhängig. Es stellt vor allem für den Tetrapyrrolring des Hämoglobins einen wichtigen Schutz vor oxydativen Veränderungen durch Wasserstoffperoxyd dar (10, 22). Glutathion Peroxidase Aktivität wurde jedoch auch in Leber, Niere, Lunge und Muskulatur nachgewiesen (23). Daraus wird die Bedeutung für den Schutz von Membranstrukturen vor Peroxidation abgeleitet.

Dabei stellt man sich folgenden Schutzmechanismus vor (39, 43): Die Glutathion Peroxidase entgiftet Lipidoxide indem sie diese zu Hydroxy-Fettsäuren reduziert und damit ihren Zerfall in freie, die Membranen schädigende Radikale verhindert. Glutathion Peroxidase katalysiert somit die Oxydation von reduziertem Glutathion entsprechend der Formel:



(GSH: reduziertes Glutathion, GSSG: oxydiertes Glutathion, Gl-px: Glutathion Peroxidase = glutathione : hydrogen peroxide oxidoreductase, EC 1.11.1.9).

Durch diese Reaktion wird das in den Zellen entstehende Wasserstoffperoxid durch Oxydation des GSH rasch in Wasser umgewandelt (42). Derartige Peroxide entstehen bei der Phagozytose (38). Vilas et al stellten fest, daß Ratten auf oxidativen Streß - induziert durch oxidiertes Maisöl in der Nahrung - mit einer Erhöhung ihrer Glutathion Peroxidase reagieren. Zu dem gleichen Ergebnis kam Chow (11), der Ratten mit einer Vitamin E freien Maisöl- und Lebertrandiät fütterte.

Vereinfachend kann also gesagt werden, daß Glutathion Peroxidase und Vitamin E die Membranen vor Peroxydation schützen (Abb. 1, Seite 4).

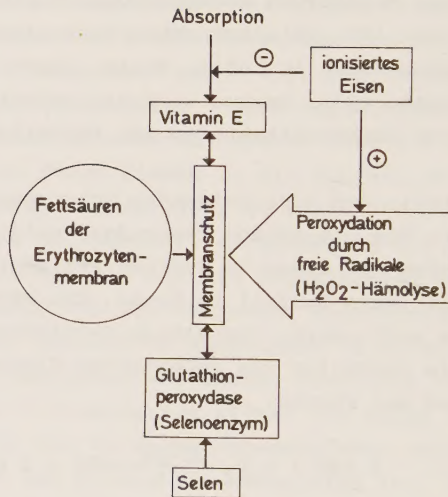
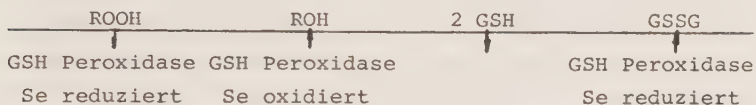


Abb. 1 Mechanismen des Membranschutzes

Dies geht auch aus dem Modell von Tappel(41) hervor, welches besagt, daß die Glutathion Peroxidase über einen "Ping-Pong-Mechanismus" wirkt, indem sie Wasserstoffperoxide (ROOH) zu Wasserstoffoxiden (ROH) reduziert:



Vitamin E hingegen wirkt als ein, die Kettenreaktion unterbrechendes Antioxidant, indem es die Peroxidation von Lipiden durch freie Radikale verhindert. Diese Kettenreaktion geht durch den Phospholipidkern der Membran hindurch und hinterläßt dabei eine Spur von Phospholipid-Wasserstoffperoxiden und an den Bruchstellen der Fettsäuren Hydroxyfettsäuren. Diese Produkte können ihrerseits nahegelegene Moleküle - einschließlich wichtiger Enzyme - durch freie Radikale, wie sie beim Zerfall von Peroxiden in OH und O⁻ entstehen, zerstören. Trifft die Kettenreaktion aber auf Vitamin E. oder Glutathion Peroxidase, so werden die freien Radikale eingefangen, bzw. die Peroxide reduziert und die Kettenreaktion ist gestoppt.

Es ist anzunehmen, daß diese Schutzmechanismen auch für den Menschen zutreffen. Dabei wird vermutet, daß ihr Fehlen zu klinischen Erscheinungen wie hämolytischer Anämie (16, 27, 28), Ikterus neonatorum (5), und sogar zu SIDS (sudden infant death syndrome) (31,13) führen kann. Letztere Vermutung wurde allerdings bei näherer Untersuchung nicht bestätigt. Gross (16) und Oski (27) zeigten, daß die bei Frühgeborenen auftretende Hämolyse durch Vitamin E vermindert, jedoch nicht eliminiert werden kann. Hier müssen also zusätzliche, spezifische Mechanismen vorhanden sein. Rotilio et al (28) beobachteten, daß bei Neugeborenen eine erniedrigte Glutathion

Peroxidase Aktivität mit hämolytischen Symptomen korreliert. Auch Bracci (8) beschreibt Neugeborenen-ikterus und hämolytische Anämie bei Kindern mit angeborenem Glutathion Peroxidase Mangel. Der Glutathion Peroxidase Mangel scheint die Erythrozyten auch gegenüber Schädigung durch Oxydantien empfänglich zu machen, denn Hämolyse durch Medikamente und eine chronische hämolytische Anämie wurde bei Erwachsenen beschrieben. Medikamente, die eine derartige Hämolyse auszulösen vermögen, scheinen denen zu entsprechen, die auch Hämolyse bei bestehendem Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel auszulösen vermögen (6,7,40).

Die klinischen Zeichen bei bestehendem Glutathion Peroxidase Mangel bestehen in Anämie, Retikulozytose und vermehrter Heinzkörperbildung. Heinzkörper sind unregelmäßig geformte Körperchen, die bezüglich ihrer Größe von winzigen Partikeln bis zu 3μ Durchmesser variieren können. Sie liegen gewöhnlich am Zellrand. Heinzkörperchen stellen präzipitiertes, denaturiertes Globin, das Endprodukt einer progressiven Sauerstoffschädigung des Hämoglobins, dar (2).

Entsprechend der Arbeit von Cohen und Hochstein (10) ist das Enzym Glutathion Peroxidase in der Lage, Wasserstoffperoxyd zu metabolisieren und damit dessen schädigende Wirkung auf Hämoglobin mit nachfolgender Heinzkörperbildung zu verhindern.

Fragestellung

Basierend auf den in der Einführung genannten Erkenntnissen und Vermutungen ist die Entwicklung der genannten Peroxidase Aktivitäten im ersten Lebensjahr, sowie die Versorgung mit dem Co-Enzym Selen von großem Interesse.

Die quantitative Bestimmung der Glutathion Peroxidase Aktivität, sowie der intraerythrozytären Selenkonzentration im Verlauf des ersten Lebensjahres ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Untersuchungsgut

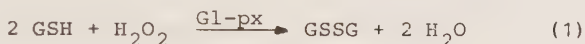
Die untersuchten Blutproben stammten von Patienten der Universitäts-Kinderklinik Erlangen. Im Zeitraum von 1/2 Jahr wurden 66 Kinder im Alter von 1 Tag bis 1 Jahr untersucht. Es erfolgte eine Unterteilung in 7 Gruppen.

- | | | | |
|----------|--------------------------------------|-------|------|
| Gruppe 1 | Neugeborene mit einem Geburtsgewicht | 2000g | n=9 |
| 2 | Neugeborene mit einem Geburtsgewicht | 2000g | n=15 |
| 3 | Kinder im Alter von 1 Monat | | n=6 |
| 4 | Kinder im Alter von 2 Monaten | | n=13 |
| 5 | Kinder im Alter von 4 Monaten | | n=7 |
| 6 | Kinder im Alter von 6 Monaten | | n=9 |
| 7 | Kinder im Alter von 1 Jahr | | n=7 |

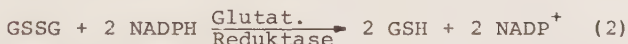
Genaue Angaben über Alter, Gewicht und Geschlecht der Kinder sind den Ergebnistabellen zu entnehmen.

Bestimmung der Aktivität der Glutathion Peroxidase

Die Enzymbestimmung erfolgte nach der Methode von Beutler (4). Die Glutathion Peroxidase katalysiert die Oxidation von reduziertem Glutathion (GSH) zu oxydiertem Glutathion (GSSG) in Anwesenheit von Wasserstoffperoxyd (H_2O_2).



In einem gekoppelten enzymatischen Test läßt sich die Aktivität der Glutathion Peroxidase über folgende, an (1) anschließende Reaktion bestimmen:



Setzt man gewaschenen Erythrozyten eine definierte Menge reduziertes Glutathion (GSH) zu und mißt das von der in den Erythrozyten befindlichen Glutathion Peroxidase gebildete oxydierte Glutathion (1) über den durch die Reaktion (2) hervorgerufenen und photometrisch meßbaren Extinktionsabfall der Reaktion $\text{NADPH} \longrightarrow \text{NADP}^+$, so gilt dieser Abfall als ein Maß für die Aktivität der Glutathion Peroxidase.

Da im Blut physiologischer Weise reduziertes Glutathion (GSH) enthalten ist, muß diese Menge über einen Leerwert I bestimmt werden und in die Aktivitätsberechnung eingehen. Für jede Probe Untersuchungsblut muß demnach ein Leerwert I im Versuch mitgeführt werden, der wie die Probe, jedoch ohne zusätzliches, reduziertes Glutathion angesetzt wird. Der Extinktionsabfall jedes Leerwertes wird vom Extinktionsabfall der entsprechenden Probe abgezogen. Damit ist garantiert, daß der Glutathion

Peroxidase in jeder Probe gleich viel reduziertes Glutathion zur Verfügung steht, und das gebildete, oxidierte Glutathion (GSSG) direkt proportional der Enzymaktivität ist.

Neben Leerwert I wird noch ein weiterer Leerwert mitgeführt. Dieser enthält im Gegensatz zu Proben und Leerwert I kein Hämolysat (gewaschene Erythrozyten + Ferricyanid), sondern nur Ferricyanid. Dadurch wird die nichtenzymatische Oxidation von reduziertem Glutathion (GSH) und NADPH durch H_2O_2 kontrolliert. Der Extinktionsabfall von Leerwert II wird ebenfalls vom Extinktionsabfall der Proben subtrahiert; er erwies sich jedoch immer als minimal und war damit zu vernachlässigen.

Reagenzien

Für eine längere Versuchsreihe wurden die Reagenzien 1-4 in größeren Mengen (50-100 ml) angesetzt und im Kühlraum aufbewahrt. Während der Dauer der Versuchsreihe (1/2 Jahr) wiesen diese Reagenzien keine Beeinträchtigung ihrer Haltbarkeit auf.

Die Reagenzien 5-8 müssen wegen ihrer, in Verdünnung sehr geringen Haltbarkeit für jeden Versuch neu angesetzt werden.

1. Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,0, 1 M

kristallisiert im Kühlraum aus und muß vor Gebrauch durch Erwärmen (Wasserbad) aufgelöst werden.

2. EDTA-Lösung, pH 7,0, 0,2 M

als weißes Pulver erhältlich, in Aqua dest. aufzulösen.

Molekulargewicht 292,25 — $292,25 \text{ g/l} = 1 \text{ M}$

$29,3 \text{ g/l} = 0,1 \text{ M}$

$58,6 \text{ g/l} = 0,2 \text{ M}$

$= 5,9 \text{ g/100 ml}$

5,9 g werden in 100 ml Aqua dest. aufgelöst und mit konzentrierter Natronlauge auf pH 7,0 titriert.

3. Natriumazid, 0,4 M

Zur Inaktivierung der Katalase, die Wasserstoffperoxid zersetzen würde.

4. Ferricyanid-Cyanid-Lösung

100 mg NaCN und 300 mg $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})$ mit Aqua bidest.
ad 1000 ml.

5. Reduziertes Glutathion (GSH), 0,1 M

ebenfalls als weißes, wasserlösliches Pulver erhältlich. MG 307,33 g/l — $0,1 \text{ M} = 30,7 \text{ g/l} = 31 \text{ mg/ml}$.

6. Glutathion Reduktase, 10 U/ml

Die Handelsform hat 120 U/ml, — $10 \text{ U/ml} = \frac{1 \text{ ml}}{12}$;
100 μl mit Aqua bidest. ad 1,2 ml.

Diese Menge reicht für 6 Ansätze à 200 μl .

7. Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) 2 mM

MG 833,36 — $2 \text{ M} = 1666,72 \text{ g/l}$ — $2 \text{ mM} = 1,67 \text{ mg/ml}$.
1 ml NADPH 2 mM reicht für 5 Ansätze.

8. Wasserstoffperoxid, 10 mM

wird vor jedem Versuch ebenfalls frisch aus 30% H_2O_2 hergestellt. Der H_2O_2 -Gehalt wird photometrisch bei 230 nm kontrolliert: 0,9 ml einer 1:10 Verdünnung

des 1 M Phosphatpuffers werden in eine Quarzküvette gegeben und die Extinktion abgelesen (Ext. 1). Nach Zugabe von 0,1 ml einer 1: 100 Verdünnung des 30% Wasserstoffperoxides wird erneut abgelesen (Ext. 2). Da der mMolare Extinktionskoeffizient von H_2O_2 bei 230 nm 0,071 beträgt, errechnet sich die H_2O_2 Konzentration (K) der verdünnten Wasserstoffperoxidlösung wie folgt:

$$K = 141 \times (\text{Ext. 2} - \text{Ext. 1}) \text{ mM} ;$$

Um diese Konzentration für den Versuch auf 10 mM einzustellen, wird 1 ml der 1:100 Lösung mit Wasser zu $\frac{K}{10}$ ml verdünnt.

Bei Zugabe dieser Wasserstoffperoxidkonzentration zu den Ansätzen verhält sich die Reaktionsgeschwindigkeit jedoch höchst unbefriedigend. Die Reaktion kommt frühestens nach 10 min zum Stillstand, was bei mehreren Ansätzen sehr zeitraubend ist. In vorliegender Arbeit wurde daher anstatt einer 1:100 Verdünnung eine 1:10 Verdünnung verwendet.

Die Reaktionszeit betrug dabei durchschnittlich 2 min.

In praxi wurde folgendermaßen vorgegangen:

Da nur Quarzküvetten mit einem Volumen von 0,5 ml verfügbar waren, wurden die in der Vorschrift angegebenen Mengen halbiert. Von einer 1:10 Pufferverdünnung wurden also 0,45 ml in die Quarzküvette gegeben, und eine Ext. 1 abgelesen und notiert.

Nun wurde eine 1:100 Wasserstoffperoxidverdünnung des 30% H_2O_2 angefertigt, und 0,05 ml davon in die Quarzküvette gegeben. Die erneute Ablesung erbrachte Ext. 2. Beide Extinktionen wurden dann in nachstehende Formel eingesetzt, die in einem Schritt die Menge X an Aqua dest. ergibt, die zu 1 ml einer 1:10 Wasser-

stoffperoxidverdünnung gegeben werden muß, um eine 10 mM Konzentration zu erhalten.

$$X = \frac{(\text{Ext. 2} - \text{Ext. 1}) \times 141}{10} - 1 ;$$

Durchführung

Unmittelbar nach Entnahme von durch Heparin anti-koaguliertem Blut werden die geformten Blutbestandteile durch Zentrifugieren vom Plasma getrennt. Die Erythrozyten werden dreimal in eiskalter, isotoner Kochsalzlösung gewaschen. Die Zellzahl der einzelnen Proben wird mit einem Coulter-Erythrozytencounter bestimmt. Anschließend wird von jeder Probe ein 1:20 verdünntes Hämolysat (mit Ferricyanid-Cyanid-Lösung) hergestellt.

Ansätze

Wegen der Überschaubarkeit des Tests ist es empfehlenswert, nicht zu viele Proben gleichzeitig anzusetzen. Die beiden Leerwerte mitgerechnet, müssen z.B. für drei Blutproben sieben Ansätze hergestellt werden:

3 Proben
+ 3 Leerwerte I
+ 1 Leerwert II

7 Ansätze

Die Ansätze werden wie folgt hergestellt:

Reagenz (siehe auch 1-8)	Probe (μ l)	Leerwert	
		I	II
Kalium-Phosphat-Puffer	200	200	200
reduziertes Glutathion	20	-	-
EDTA-Lösung	40	40	40
Glutathion Reduktase	200	200	200
Natriumazid	20	20	20
NADPH	200	200	200
Ferricyanid-Cyanidhämolysat	50	50	50 reine Ferricyanid-
Aqua bidest. ad 1030 μ l	300	320	320
		1030 μ l	1030 μ l

Nach Mischen der Ansätze erfolgt die Inkubation bei 37°C für 10 Minuten. Danach Überführung in auf 37°C thermostatisierte Photometerküvetten.

Die Enzymreaktion wird jeweils durch Zugabe von 20 μ l 10 mM H₂O₂ gestartet. Der Extinktionsabfall wird bei 340 nm abgelesen und durch einen angeschlossenen Transskriptionsschreiber (Fa. Eppendorf) aufgezeichnet (Anlage 1).

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgt nach der Formel:

$$\frac{\text{Ext. Abfall (Probe)} - \text{Ext. Abf. L I} - \text{Ext. Abf. L II}}{\text{Zahl der Erythrozyten im Ansatz}}$$

Die Enzymaktivität wird pro 10⁸ Erythrozyten angegeben.

Bestimmung der erythrozytären Selenkonzentration

Die Bestimmung des Selengehaltes der Erythrozyten erfolgte fluoreszenzspektrophotometrisch nach der Methode von Watkinson (44). Diese beruht auf der Fluoreszenzmessung des Piazselenols von 2,3-Diaminonaphtalin. Die untere Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei ca. 0,02 μg Selen (0,02 ppm in einer Probe von 1 g).

Reagenzien

1. EDTA-NH₂OH-Lösung

Dafür werden 4 g Äthylendiamintetraacetat (EDTA) in ca. 20 ml Aqua dest. suspendiert und durch langsam zugegebene 5 N NH₄OH aufgelöst. Etwas mehr NH₄OH schadet nichts.

12 g NH₂OH HCl (Hydroxylammoniumchlorid) werden in 100 ml Aqua dest. aufgelöst und zu obiger EDTA-Lösung gegeben.

Das ganze mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen.

Diese Lösung wurde im Kühlraum aufbewahrt, und für die Dauer der Versuchsreihe (1/2) wurde

keine Beeinträchtigung der Haltbarkeit festgestellt.

2. Kresolrot-Indikator, Umschlagspunkt pH 1,0

Zu 20 mg Kresolrot (o-Kresolsulfonphtalein) wird ein Tropfen 5% NaOH gegeben und zum Durchfeuchten geschüttelt. Mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen. Auch diese Lösung wurde im Kühlraum aufbewahrt.

3. Selen-Standardlösung

Zu 40 mg elementarem Selen (99 + % rein) werden etwa 10 ml konzentrierte Salpetersäure (HNO_3) gegeben und zum Auflösen im Wasserbad erwärmt. Auf Raumtemperatur abgekühlt, wird mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt und durch Schütteln gemischt. 1 ml dieses Gemisches wird in einen 30 ml Mikro-Kjeldahl-Kolben (auch normale 20 oder 40 ml Kolben aus dickerem Glasa sind brauchbar) überführt und nach Zugabe einer Glasperle und 2 ml 70% HClO_4 (Perchlorsäure) auf einer Heizplatte (vgl. Apparatur) erhitzt. Nach dem Erscheinen von Perchlorsäuredämpfen (weiße, stark nach Chlor riechende Rauchschwaden) wird noch 2-3 Minuten weitergekocht. Nun den Glaskolben von der Heizplatte nehmen und vorsichtig kühlen (Gefahr des Zerspringens des Kolbens). Nach dem Abkühlen 1 ml Aqua dest. sowie 1 ml 1 + 4 $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ -Lösung (englischer Sprachgebrauch, entspricht deutsch 1:5 $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ Mischung) hinzufügen. Den Kolben 30 Minuten lang in kochendes Wasserbad stellen. Nach dem Abkühlen mit 1 N HCl auf 1000 ml auffüllen.

Es empfiehlt sich, den Standard zusammen mit den ersten Proben anzusetzen (s.u.), da diese dem gleichen Prozeß unterworfen werden.

Die Selen-Standardlösung ist für 3 Monate stabil, danach zerfällt das elementare Selen und die Extinktion am Fluorometer fällt ab. Es wird daher empfohlen, den Standard alle 10-14 Tage zu erneuern.

4. 2,3-Diaminonaphthalin (DAN) - Lösung

Die Lösung muß im Halbdunkeln zubereitet werden, da das Diaminonaphthalin lichtempfindlich ist und daher auch im Dunkeln aufbewahrt werden muß.

Zu 100 mg Diaminonaphthalin werden langsam, unter gelegentlichem Schütteln, 100 ml 0,1 N HCl gegeben. Die Klümpchen, die sich durch Schütteln nicht auflösen lassen, lösen sich meist während des nun anschließenden Wasserbades von 15 Minuten bei 50°C. Nach Kühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung zweimal mit je 10 ml Cyclohexan ausgeschüttelt, wobei jedesmal die überstehende Cyclohexanschicht mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt wird. Die so entstandene wasserklare Lösung wird durch mit Wasser gesättigtes, grobes Filterpapier gefiltert und muß sofort verwendet werden.

Da die DAN-Lösung immer frisch zubereitet werden muß, läßt sich die anzusetzende Menge auf die jeweilige Zahl der zu untersuchenden Blutproben abstimmen. Je Probe werden 5 ml DAN-Lösung benötigt, für 3 Proben plus Leerwert und Standard würden also nur 25 ml DAN-Lösung nötig sein.

Nach Anleitung erhält man ca. 100 ml, das sind - wenn man 15 ml für das Absaugen erlaubt - 60 ml zuviel. In praxi wurden für 3 Proben 40 mg Diaminonaphthalin angesetzt und in - entsprechend - 40 ml 0,1 N HCl aufgelöst.

Apparatur

1. Kjeldahl-Verdauungseinheit mit gläserner Absaugvorrichtung. In vorliegender Arbeit wurde eine Elektroheizvorrichtung verwendet, in der die Glas-

kolben aufrecht stehen konnten und mit den Kolbenenden in ein gläsernes Absaugerohr mündeten. Zusätzlich befand sich die ganze Vorrichtung in einem Abzug.

2. Ein Fluorometer, das über eine Anregungswellenlänge von 370 nm und eine Emissionswellenlänge von 525 nm (in vorliegender Arbeit wurde die Extinktion bei 515 nm gemessen) verfügt. Es wurde ein Fluoreszenz-Spektrophotometer Typ 204-A (Perkin-Elmer) verwendet.
3. Ein 50°C Wasserbad mit Abdeckung oder in einem dunklen Raum.
Ein zweites Wasserbad mit kochendem Wasser ist vorteilhaft.

Durchführung (vgl. Ablaufdiagramm Anlage 2)

Die Bestimmung des Selengehaltes der Erythrozyten erfolgte innerhalb einer Stunde nach Blutentnahme. Von den gewaschenen und auf Zellzahl untersuchten (vgl. Bestimmung der Glutathion Peroxidase) Erythrozyten wurde 1 ml in 30 ml Mikro-Kjeldahl-Kolben überführt. (Im Hinblick auf das Alter der untersuchten Kinder wurde die Menge des in den Ansatz eingehenden Untersuchungsmaterials so niedrig wie möglich gehalten.) Zu 1 ml gewaschene Erythrozyten werden 10 ml konzentrierte Salpetersäure (HNO_3) zur Vorverdauung gegeben. Diese erfolgte bei Zimmertemperatur innerhalb der nächsten 12 Stunden. Zur Vermeidung von Siedeverzug wurde jedem Ansatz eine Glasperle zugefügt und langsam erhitzt. Wenn die Gefahr des

Überschäumens vorbei ist und sich HNO_3 -Rauch im Flaschenhals kondensiert hat, noch 10-15 Minuten weiter kochen lassen, bis kein HNO_3 -Rauch mehr aufsteigt. Die Kolben von der Heizvorrichtung nehmen und kühlen (Vorsicht, Gefahr des Zerspringens). Von diesem Punkt an wird die vorbereitete Selen-Standardlösung (vgl. Reagenzien) mitgeführt. In jeden Kolben 2 ml 70% Perchlorsäure geben, wobei das innen am Flaschenhals haftende Kondensat mit abgespült wird. Die Kolben erneut auf die Heizvorrichtung stellen und 15 Minuten lang leicht kochen, um eine maximale Verdauung des im Blut enthaltenen Eiweißes, sowie der Salpetersäure zu gewährleisten. Falls die Mischung während des Kochvorganges anbrennen sollte, einige ml HNO_3 dazugeben und durch Schütteln und erneutes Aufkochen auflösen.

Nach der zweiten, 15-minütigen Kochphase die Kolben kühlen, 1 ml Aqua dest. und 1 ml 1 + 4 $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ dazugeben und 30 Minuten lang in kochendes Wasserbad stellen. Nach Ablauf der 30 Minuten die Kolben herausnehmen und kühlen. Die Proben müssen nun eine hellgelbe Farbe haben.

Während der 30-minütigen Kochphase können Standard und Leerwert angesetzt werden: In zwei Glaskolben - wenn möglich von gleicher Art wie die für die Proben verwendeten - werden je 2 ml 70% Perchlorsäure gegeben. Dem Standard wird 1 ml Selen-Standardlösung (siehe Reagenzien) hinzugefügt.

Nach abgeschlossener Verdauungsphase der Proben folgt nun die Selen-Komplexbildung, bei der Proben, Standard und Leerwert parallel laufen.

Zu jedem Kolben werden je 5 ml EDTA-NH₂OH-Lösung (siehe Reagenzien) gegeben und durch Schütteln mit den Ansätzen vermischt. Nun werden je 2 Tropfen Kresolrot-Indikator in die Kolben gegeben, worauf die Proben die Farbe des Indikators annehmen müssen und sich kräftig rosa färben.

Falls die Proben nicht richtig vorverdaut sind, wird die Indikatorfarbe 'verschluckt' und der Titriervorgang zur Einstellung des optimalen pH ist nicht möglich. In diesem Zusammenhang wurde auch untersucht, ob Plasma oder Serum leichter zu titrieren wäre als gewaschene Erythrozyten. Die Farbumschläge waren bei Serum und Plasma zwar schärfer, aber mit Verbesserung des Verdauungsvorganges (längeres Kochen) konnten wieder gewaschene Erythrozyten verwendet werden, wodurch die mengenmäßige Beziehung (Selengehalt pro Erythrozyten, s.u.) gewährleistet wurde.

Durch Zugabe von 2-3 ml 5 N NH₄OH wird ein Farbumschlag von rosa nach gelb erzielt, der mit einigen Tropfen 1+4 HCl:H₂O auf orange-rosa zurücktitriert wird. Die Bezeichnung 'orange-rosa' erwies sich jedoch als zu vage, da der Leerwert und der Standard immer blasser als die Proben sind. Es wurde daher mit Hilfe eines pH-Meters der pH-Wert genau auf pH = 1 eingestellt, was dem pH-Meßbereich für Fluoreszenzmessungen entspricht.

Von der - ebenfalls während der 30-minütigen Kochphase vorbereiteten - Diaminonaphthalinlösung (siehe Reagenzien) werden nach der pH-Einstellung 5 ml in jeden Ansatz gegeben; ab jetzt nur noch im Halbdunkeln arbeiten. Die Kolben werden mit ca. 20 ml 0,1 N HCl aufgefüllt und gut gemischt. Während des

anschließenden Wasserbades von 25 Minuten bei 50°C muß nach den ersten 10 Minuten jeder Kolben nochmals geschüttelt werden. Nach Ablauf der 25 Minuten die Ansätze in kaltem Wasserbad auf Raumtemperatur abkühlen. Während des 25-minütigen Wasserbades können der Anzahl der Ansätze entsprechend viele Scheidetrichter mit je 10 ml Cyclohexan ("zur Fluoreszenz") gefüllt werden. In diese werden die Ansätze nach dem Abkühlen überführt. Beim Überführen werden 5-10 ml Aqua dest. zum Nachspülen verwendet.

Die Scheidetrichter werden nun 30 Sekunden lang (Stoppuhr!) kräftig geschüttelt und anschließend 10-15 Minuten in den Kühlraum gestellt, um die Abtrennung der Cyclohexanphase, in die der Selenkomplex übergeht, zu beschleunigen. Wenn sich die Cyclohexanphase scharf von der unteren, wässrigen Phase abgrenzt, wird diese abgelassen und verworfen. Die Cyclohexanphase wird mit 25 ml 0,1 N HCl nochmals kräftig geschüttelt und kurz in den Kühlraum zur erneuten Abscheidung gestellt. Danach wird wieder die untere Phase verworfen. Das sich noch im Scheidetrichter befindliche Cyclohexan wird in 12 ml Zentrifugengläser überführt und etwa 1 Minute bei mäßiger Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Cyclohexanüberstand wird in Fluorometerküvetten gegeben und gegen den Leerwert abgelesen.

Anmerkung: Die verwendeten Glaskolben müssen nach Gebrauch sehr sorgfältig gespült werden, da das Selen an den Glaswänden haftet.

Auswertung

Der am Fluorometer für die jeweilige Probe abgelesene Meßwert geht in folgende Formel ein:

$$0,4 \times \text{Meßwert}$$

$$\text{Standard} \times \text{Zahl der Erythrozyten}$$

Die Selenkonzentration wird in $\mu\text{g}/\text{Zahl der Erythrozyten}$ angegeben.

Neugeborene mit Geburtsgewicht unter 2000g

Ergebnisse

Name	Alter	Geschlecht	Gewicht (g)	Glutathion Peroxidase (IE/10 ⁸ Erythrozyten)	Selen (µg/10 ⁸ Ery)
B.	2 Tg	m	1810	36,09	2,07
E.	3 Tg	w	1630	25,59	1,98
S.	3 Tg	w	1850	29,04	2,29
S.	3 Tg	w	1630	31,78	3,01
B.	2 Tg	m	1700	31,00	3,41
A.	8 Tg	m	1600	28,13	1,73
K.	1 Tg	m	1940	30,04	1,68
K.	1 Tg	m	1740	33,00	2,20
R.	3 Tg	w	1600	33,18	4,35
$\bar{x} = 1722,22$				$\bar{x} = 30,87$	$\bar{x} = 2,52$
$s = 122,04$				$s = 2,1$	$s = 0,89$

n = 9

Neugeborene mit Geburtsgewicht über 2000g

Name	Alter	Geschlecht	Gewicht (g)	Glutathion Peroxidase (IE/10 ⁸ Erythrozyten)	Selen (µg/10 ⁸ Ery)
Z.	1 Tg	m	3800	34,88	2,16
K.	4 Tg	m	3580	30,22	2,90
D.	3 Tg	w	2660	47,31	1,68
S.	5 Tg	m	2680	47,47	1,49
H.	4 Tg	w	2600	49,13	2,19
H.	3 Tg	m	3420	38,01	3,04
E.	5 Tg	w	3890	20,00	1,39
D.	14 Tg	w	3550	26,13	2,74
W.	4 Tg	w	2800	17,39	2,28
K.	5 Tg	w	3380	45,51	3,51
E.	3 Tg	w	2180	28,82	1,76
F.	4 Tg	m	3200	32,00	2,26
J.	6 Tg	m	2960	30,70	2,03
B.	4 Tg	m	3520	33,97	2,05
n = 15				$\bar{x} = 35,16$	$\bar{x} = 2,18$
				s = 514,57	s = 0,63

Altersgruppe 1 Monat

Name	Alter	Geschlecht	Gewicht (g)	Glutathion Peroxidase (IE/10 ⁸ Erythrozyten)	Selen (µg/10 ⁸ Ery)
L.	1 Mon	m	4120	35,82	2,42
W.	1 Mon	w	3920	36,07	1,82
K.	1 Mon	w	4500	42,72	3,62
G.	1,5 M	m	3690	37,83	2,51
B.	1,5 M	m	2690	25,95	1,55
D.	1,5 M	w	3800	40,31	0,84
n = 6				$\bar{x} = 36,45$	$\bar{x} = 2,12$
				s = 5,7	s = 0,95

Altersgruppe 2 Monate

Name	Alter	Geschlecht	Gewicht (g)	Glutathion Peroxidase (IE/10 ⁸ Erythrozyten)	Selen (µg/10 ⁸ Ery)
Z.	2 Mon	w	5200	22,50	-
K.	2 Mon	m	5900	47,10	0,68
A.	2 Mon	w	4900	31,70	1,09
G.	2 Mon	m	3400	32,00	1,15
G.	2 Mon	w	3710	24,90	1,09
B.	2 Mon	m	3300	30,70	-
M.	2 Mon	w	3850	33,70	1,17
B.	2 Mon	w	3490	47,61	1,58
T.	2 Mon	m	3930	40,61	1,27
D.	2 Mon	m	4890	32,58	2,48
W.	2 Mon	m	2570	47,46	2,41
S.	3 Mon	w	3780	50,96	1,72
K.	2 Mon	m	3100	46,25	1,35
n = 13			$\bar{x} = 4001,5$	$\bar{x} = 38,51$	$\bar{x} = 1,46$
			s = 947,7	s = 10,6	s = 0,58

Altersgruppe 4 Monate

Name	Alter	Geschlecht	Gewicht (g)	Glutathion Peroxidase (IE/10 ⁸ Erythrozyten)	Selen (µg/10 ⁸ Ery)
J.	4 Mon	m	6700	30,40	1,69
D.	4 Mon	m	3030	40,70	-
W.	4 Mon	m	5980	39,70	-
C.	4,5 M	m	3630	23,92	1,03
S.	4,5 M	w	5700	38,08	1,22
W.	4 Mon	m	6700	41 33	1,84
B.	5 Mon	w	4650	30,59	1,07
$\bar{x} = 5198,57$				$\bar{x} = 34,96$	$\bar{x} = 1,37$
$s = 1462,57$				$s = 6,6$	$s = 0,37$

n = 7

Altersgruppe 6 Monate

Name	Alter	Geschlecht	Gewicht (g)	Glutathion Peroxidase (IE/10 ⁸ Erythrozyten)	Selen (µg/10 ⁸ Ery)
C.	6 Mon	w	7600	24,73	2,11
H.	6 Mon	m	6290	40,30	0,93
T.	6 Mon	m	9000	32,12	1,16
N.	5,5 M	m	7700	33,90	1,36
K.	6 Mon	w	6060	24,26	1,07
S.	6 Mon	w	5980	39,68	0,90
W.	6 Mon	w	8250	34,92	1,35
B.	7 Mon	w	6310	29,82	1,17
B.	5 Mon	m	8340	30,46	1,01

n = 9

$\bar{x}$ = 7281,11
s = 1140,24

$\bar{x}$ = 32,24
s = 5,7

$\bar{x}$ = 1,22
s = 0,36

Altersgruppe 12 Monate

Name	Alter	Geschlecht	Gewicht (g)	Glutathion Peroxidase (IE/10 ⁸ Erythrozyten)	Selen (µg/10 ⁸ Ery)
E.	12 M	m	8500	27,69	1,38
W.	12 M	m	8900	2604	2,03
G.	9 M	w	8150	29,05	1,87
G.	14 M	w	9300	30,29	0,92
K.	14 M	w	13000	29,76	0,92
W.	11 M	w	9400	27,60	0,79
T.	12 M	m	10250	31,48	0,59
n = 7			$\bar{x} = 9642,86$	$\bar{x} = 28,84$	$\bar{x} = 1,21$
			s = 1627,99	s = 1,86	s = 0,56

Diskussion der Glutathion Peroxidase Aktivität

In Abb. 2 sind die Glutathion Peroxidase Aktivitäten der Erythrozyten im Verlauf des ersten Lebensjahres als Mittelwerte aus den 7 Altersgruppen dargestellt.

	n	$\bar{x}$	s	
Neugeborene unter 2000g	9	30,87	2,1	IE/10 ⁸ Ery
Neugeborene über 2000g	15	35,16	10,1	IE/10 ⁸ Ery
Altersgruppe 1 Monat	6	36,45	5,7	IE/10 ⁸ Ery
Altersgruppe 2 Monate	13	38,51	10,6	IE/10 ⁸ Ery
Altersgruppe 4 Monate	7	34,96	6,6	IE/10 ⁸ Ery
Altersgruppe 6 Monate	9	32,24	5,7	IE/10 ⁸ Ery
Altersgruppe 12 Monate	7	28,84	1,8	IE/10 ⁸ Ery

Bei der Bestimmung des linearen Korrelationskoeffizienten ergab sich zwischen den einzelnen Altersgruppen kein signifikanter ($p > 0,01$) Unterschied, d.h. die Glutathion Peroxidase Aktivität der Erythrozyten weist im Verlauf des ersten Lebensjahres keine wesentlichen Aktivitätsschwankungen auf. Lediglich bei sehr unreifen Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 2000g ist im Mittelwert eine verminderte Enzymaktivität feststellbar.

Unsere Ergebnisse stimmen mit Vetrella (42) überein, der eine über das ganze Leben konstant bleibende Glutathion Peroxidase Aktivität beschreibt. Ebenso fand Rotilio (28) bei der Bestimmung der Glutathion Peroxidase Aktivität von Neugeborenen, daß diese mit der Enzymaktivität von Erwachsenen übereinstimmt.

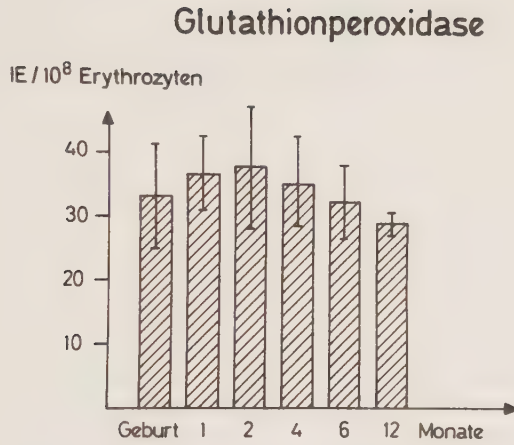


Abb. 2 Glutathion Peroxidase Aktivität der
Erythrozyten im Verlauf des ersten
Lebensjahres

Auch Lombeck (18) stellte für die Altersspanne von 1-40 Jahre keine signifikanten Unterschiede in der Enzymaktivität fest. Die Autoren Bracci (8) und Gross (15) zeigen jedoch, daß die Aktivität der Glutathion Peroxidase bei Frühgeborenen sowie auch bei ausgetragenen Neugeborenen reduziert ist. Diese Autoren sehen in ihren Ergebnissen die Erklärung für die vermehrte Heinzkörperchenbildung sowie für die Empfindlichkeit gegenüber einer medikamentös induzierbaren Hämolyse bei Neugeborenen. Der Unterschied zwischen den Ergebnissen dieser Autoren (8, 15 und auch 20) und unseren ist sehr wahrscheinlich auf die verschiedenen Bezugssysteme für die Enzymaktivität zurückzuführen. Die Enzymaktivität unserer Ergebnisse - wie auch die von Vetrella (42) - ist auf die Zellzahl bezogen, während andere Autoren auf den Hämoglobingehalt beziehen. Der erhöhte Hämoglobingehalt der Erythrozyten des Neugeborenen führt bei diesem Bezugsparameter zu einer Verminderung der Enzymaktivität. Aktivitätsmessungen der Glutathion Peroxidase bei Föten zwischen der 20. und 28. Schwangerschaftswoche zeigten, daß das Enzym bereits in der Pränatalperiode voll entwickelt ist (42). Die beschriebene Empfindlichkeit der Neugeborenenerythrozyten läßt sich also nicht durch eine verminderte Aktivität der Glutathion Peroxidase erklären. Untersuchungen von Schröter und Bitter (32) lenken die Aufmerksamkeit vielmehr auf die in der Erythrozytenmembran lokalisierten SH-Gruppen als mögliche Ursache der Vulnerabilität. In den Erythrozytenmembranen sind ca. 5% der gesamten Thiolgruppen der Erythrozyten lokalisiert. Der Reduktionsgrad dieser Thiolgruppen hat für die Stabilität der Neugeborenenerythrozyten wahrscheinlich eine große Bedeutung.

Diskussion der Selenkonzentration der Erythrozyten

Eine graphische Darstellung der Selenkonzentration der Erythrozyten im Verlauf des ersten Lebensjahres zeigt Abbildung 3 (Seite 34).

Die statistische Überprüfung der gemessenen Selenkonzentrationen zwischen Neugeborenenalter und dem Alter von 12 Monaten erfolgte mittels eines unverbundenen t-Tests.

	n	$\bar{x}$	s	
Neugeborene				
- unter 2000g Geb.gew.	9	2,52	0,89	$\mu\text{g}/10^8\text{Ery}$
- über 2000g Geb.gew.	15	2,18	0,63	$\mu\text{g}/10^8\text{Ery}$
Altersgruppe 1 Monat	6	2,12	0,95	$\mu\text{g}/10^8\text{Ery}$
Altersgruppe 2 Monate	13	1,46	0,58	$\mu\text{g}/10^8\text{Ery}$
Altersgruppe 4 Monate	7	1,37	0,37	$\mu\text{g}/10^8\text{Ery}$
Altersgruppe 6 Monate	9	1,22	0,36	$\mu\text{g}/10^8\text{Ery}$
Altersgruppe 12 Monate	7	1,21	0,55	$\mu\text{g}/10^8\text{Ery}$

Die Ergebnisse weisen einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten der Gruppe 1 und denjenigen der Gruppe 7 auf ($p < 0,01$). Dabei sind die Werte der Neugeborenenengruppe ungefähr doppelt so hoch wie diejenigen der Altersgruppe 12 Monate. Innerhalb der Gruppe der Neugeborenen ist der Selengehalt der Erythrozyten bei Kindern mit einem Geburtsgewicht von unter 2000g höher als bei einem Geburtsgewicht von über 2000g.

Die Ergebnisse stimmen mit Alexiou (1) überein, der den Gehalt an Spurenelementen der menschlichen Plazenta im Vergleich zu dem in der Leber des

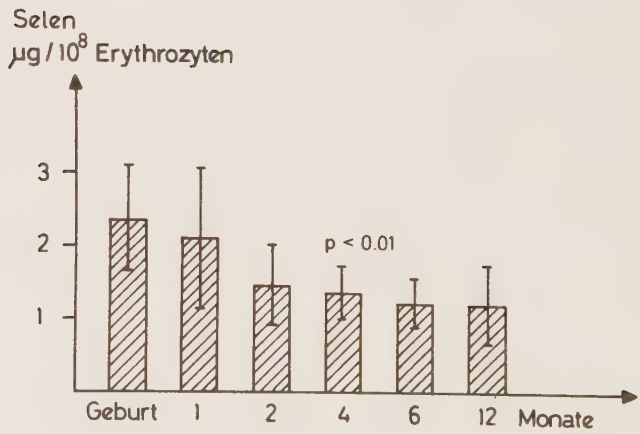


Abb. 3 Selenkonzentration der Erythrozyten
im Verlauf des ersten Lebensjahres

Neugeborenen untersuchte. Er stellte fest, daß die essentiellen Spurenelemente (Zink, Kobalt und Selen) in der Leber des Neugeborenen in signifikant höherer Konzentration vorliegen als in der Plazenta. Eine pränatale Anreicherung des Selens wäre damit zu diskutieren.

Betrachtet man Abb. 3 genauer, so bemerkt man, daß die Mittelwerte der einzelnen Altersgruppen bis zum Ende des ersten Lebensmonates leicht abfallen. Im zweiten Monat fällt der Wert steil ab, um schließlich vom 3. bis zum 12. Monat sehr langsam auf den vom Neugeborenenwert signifikant verschiedenen Wert bei 1 Jahr abzusinken. Auch Lombeck (18) stellt ein Absinken des Selenspiegels im Alter von 1-4 Monaten fest. Sie führt dies auf die geringe Selenzufuhr mit den Säuglingsmilchen zurück. Die tägliche Selenzufuhr wird mit Säuglingsnahrung auf 3,5 µg im Vergleich zu 56-197 µg beim Erwachsenen geschätzt (45).

Zusammenfassung

Im Blut von Früh- und Neugeborenen sowie Säuglingen bis zum Alter von einem Jahr wurden die Enzymaktivität der Glutathion Peroxidase und die Selenkonzentration in den Erythrozyten bestimmt. Das Enzym zeigte über den Zeitraum des ersten Lebensjahres keine Aktivitätsschwankungen, wohingegen die Selenkonzentration bei Neugeborenen doppelt so hoch lag wie bei einjährigen Kindern.

Eine direkte Abhängigkeit der Aktivität des Selenoenzyms Glutathion Peroxidase vom Selengehalt der Erythrozyten (wie im Tierversuch beobachtet) konnte nicht festgestellt werden. Um diese Frage vollständig beim Menschen zu klären wären "Fütterungsversuche", wie sie bei Ratten und Hühnern durchgeführt wurden, erforderlich.

Vorliegende Arbeit ist der Versuch, quantitative Angaben zur Diskussion über die "Membranschützer" Glutathion Peroxidase und Selen beizutragen.

Literatur

1. Alexiou D., Grimanis A.P., Grimanis M., Papaevangelou G., Koumantakis E., Papadatos C.
Trace elements (Zinc, Cobalt, Selenium, Rubidium, Bromine, Gold) in human placenta and newborn liver at birth
Pediat. Res. 11, 646-648 (1977)
2. Allen D.W., Jandl J.H.
Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin
II. Role of thiols in oxidant drug action
J. Clin. Invest. 40, 454 (1961)
3. Beutler E., Beutler B., Matsumoto R.
Glutathione peroxidase activity of inorganic selenium and seleno-DL-cysteine
Experientia 31 (7), 769-770
4. Beutler E.
Red cell metabolism
Grune and Stratton, New York, London 1971, S. 66
5. Bienzle U., Effiong C., Aimaku V., Luzzato L.
Erythrocyte enzymes in neonatal jaundice
Acta Haematol. (Basel) 55 (1), 10-20 (1976)
6. Boivin P., Galand C., Hakim J., Roge J., Gueroult N.
Anémie hémolytic avec déficit en glutathione peroxidase chez un adulte
Enzymol. Biol. Clin. 10, 68 (1969)

7. Boivin P., Galand C., Hakim J., Blery M.
Déficit en glutathione peroxidase erythrocytaire
et anémie hémolytique médicamenteuse
La Presse Med. 78, 171 (1970)
8. Bracci R.
Il deficit de glutathione peroxidase eritrocitaria
nel neonate con malattia emolitica
Minerva Pediatr. 51, 2692 (1968)
9. Calvert C.C., Nesheim M.C., Scott M.L.
Effectiveness of selenium in prevention of
nutricional muscular dystrophy in the chick
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 95, 621
10. Chow C.K., Reddy K., Tappel A.L.
Effect of dietary vitamin E on the activities
of the glutathione peroxidase system in rat tissue
J. Nutr. 103, 618-624 (1973)
11. Cohen C., Hochstein P.
Glutathion peroxidase: the primary agent for
the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes
Biochemistry 2, 1420 (1963)
12. Cooper W.C., Glover J.R.
The toxicology of selenium and its compounds
In: Selenium 654-674.
Editors: Zingaro R.A., Cooper W.C.,
van Nostrand Reinhold Co. 1974
13. Cowgill U.M.
Letter: Selenium and neonatal death
Lancet 1 (7963) 816-817, 10 April 1976

14. Flohé L., Günzler W.A., Schock H.H.
Glutathione Peroxidase: A selenoenzyme
FEBS Letters 32 (1), 132-134 (1973)
15. Gross R.T., Bracci R., Rudolph N., Schroeder E.,
Kochen J.A.
Hydrogen peroxide toxicity and detoxification in
the erythrocytes of newborn infants.
Blood 28 (4) Part I, April 1967
16. Gross S.J., Landaw S.A., Oski F.A.
Vitamin E and neonatal hemolysis
Pediatrics 59 Suppl. (6 PT 2), 995-7, June 1977
17. Hsieh S.H., Ganther H.E.
Acid-volatile selenium formation catalyzed
by glutathione reductase
Biochemistry 14 (8), 1632-1636 (1975)
18. Lombeck I., Kasperek K., Harbisch H.D.,
Feinendegen L.E., Bremer H.J.
The selenium state of healthy children
Europ. J. Pediatr. 125, 81-88 (1977)
19. Lombeck I., Kasperek K., Feinendegen L.E.,
Bremer H.J.
Serum-selenium concentrations in patients with
maple-syrup-urine disease and phenylketonuria
under dieto-therapy.
Clin. Chim. Acta 64, 57-61 (1975)
20. Macdougall L.G.
Red cell metabolism in iron deficiency anemia
Journ. Pediatr. 80 (5), 775-782 (1972)

21. Mills G.C.
Hemoglobin catabolism
I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme
which protects hemoglobin from oxidative breakdown
J. Biol. Chem. 229, 189 (1957)
22. Mills G.C., Randall H.P.
Hemoglobin catabolism
II. The protection of hemoglobin from oxidative
breakdown in the intact erythrocyte
J. Biol. Chem. 232, 589 (1958)
23. Mills G.C.
Glutathione peroxidase and the destruction of
hydrogenperoxide in animal tissue
Arch. Biochem. 86, 1 (1960)
24. Muth O.H., Weswig P.H., Whanger P., Oldfield J.E.
Effect of feeding selenium-deficient ration to
the subhuman primate
Amer. J. Res. 32, 1603-1605 (1973)
25. Noguchi T., Cantor A.H., Scott H.L.
Mode of action of selenium and vitamin E in
prevention of exsudative diathesis in chicks
J. Nutr. 103, 1502-11 (1973)
26. Patterson E.L., Milstrey R., Stokstad E.L.R.
Effect of selenium in preventing exsudative
diathesis in chicks
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109, 16

27. Oski F.A., Barness L.A.
Vitamin E deficiency: a previously unrecognized
cause of hemolytic anemia in the premature infant
J. Pediat. 70 (2), 211-220 (1967)
28. Rotilio G., Rigo A., Bracci R., Bagnoli F.,
Sargentini I., Brunori M.
Determination of red blood cell superoxide
dismutase and glutathione peroxidase in newborns
in relation to neonatal hemolysis
Clin. Chim. Acta. 81 (2), 131-134 (1977)
29. Rotruck J.T., Pope A.L., Ganther H.E., Hafeman D.G.,
Hoekstra W.G.
Selenium: Biochemical role as a component of
glutathione peroxidase
Science 179, 588-590 (1972)
30. Rudolph N., Wong S.L.
Selenium and glutathione peroxidase activity
in maternal and cord plasma and red cells
Pediat. Res. 12, 789 (1978)
31. Schrauzer G.N., Rhead W.J., Saltzstein S.L.
Sudden infant death syndrome: Plasma vitamin E
levels and dietary factors
Ann Clin Lab Sci 5 (1), 31-37 (1975)
32. Schröter W., Bitter K.
Die Bedeutung intrazellulärer und membrangebundener
SH-Gruppen für die Stabilität von Neugeborenen-
erythrozyten
7. Arbeitstagung für pädiatrische Forschung
Marburg 14.-15. Februar 1969

33. Schwarz K. Foltz C.M.
Selenium as an integral part of factor 3 against
dietary necrotic liver degeneration
J. Amer. Chem. Soc. 79, 3292 (1957)
34. Schwarz K., Bieri J.G., Briggs G.M., Scott M.L.
Prevention of exsudative diathesis in chicks
by factor 3 and selenium
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 95, 621
35. Scott M.L., Noguchi T., Combs G.F.
New evidence concerning mechanisms of action
of vitamin E and selenium
Vitamine und Hormone 32, 429-444 (1974)
36. Scott M.L.
The selenium dilemma
J. Nutr. 103, 803-810 (1973)
37. Scott M.L., Noguchi T.
Metabolic function of selenium in prevention of
exsudative diathesis in chicks
Federation Proc. 32, 3747
38. Serfass R.E., Ganther H.E.
Effects of dietary selenium and tocopherol on
glutathione peroxidase and superoxide dismutase
activities in rat phagocytes
LIFE Science 19, 1139-1144 (1976)
39. Smith P.J., Tappel A.L., Chow C.K.
Glutathione peroxidase activity as a function of
dietary seleno-methionine
Nature 247, 392-393 (1974)

40. Steinberg M., Brauer M.J., Necheles T.F.
Acute hemolytic anemia associated with
erythrocyte glutathione peroxidase deficiency
Arch. Int. Med. 125, 302 (1970)
41. Tappel A.L.
Selenium-glutathione peroxidase and vitamine E
Am. J. Clin. Nutr. 27 960-965 (1974)
42. Vetrella M., Barthelmai W., Rietkötter J.
Aktivität der Glutathion Peroxidase in Erythro-
cyten vom Fetal- bis zum Erwachsenenalter.
43. Vilas N.N., Bell R.R., Draper H.H.
Influence of dietary peroxides, selenium and
vitamin E on glutathione peroxidase of the
gastrointestinal tract
J.Nutr. 106 (5), 589-596 (1976)
44. Watkinson J.H.
Fluorometric determination of selenium in
biological material with 2,3-diaminonaphthalene
Anal. Chem. 38, 92 (1966)
45. Watkinson J.H.
The selenium status of New Zealanders
N.Z. Med. J. 523, 202 (1974)

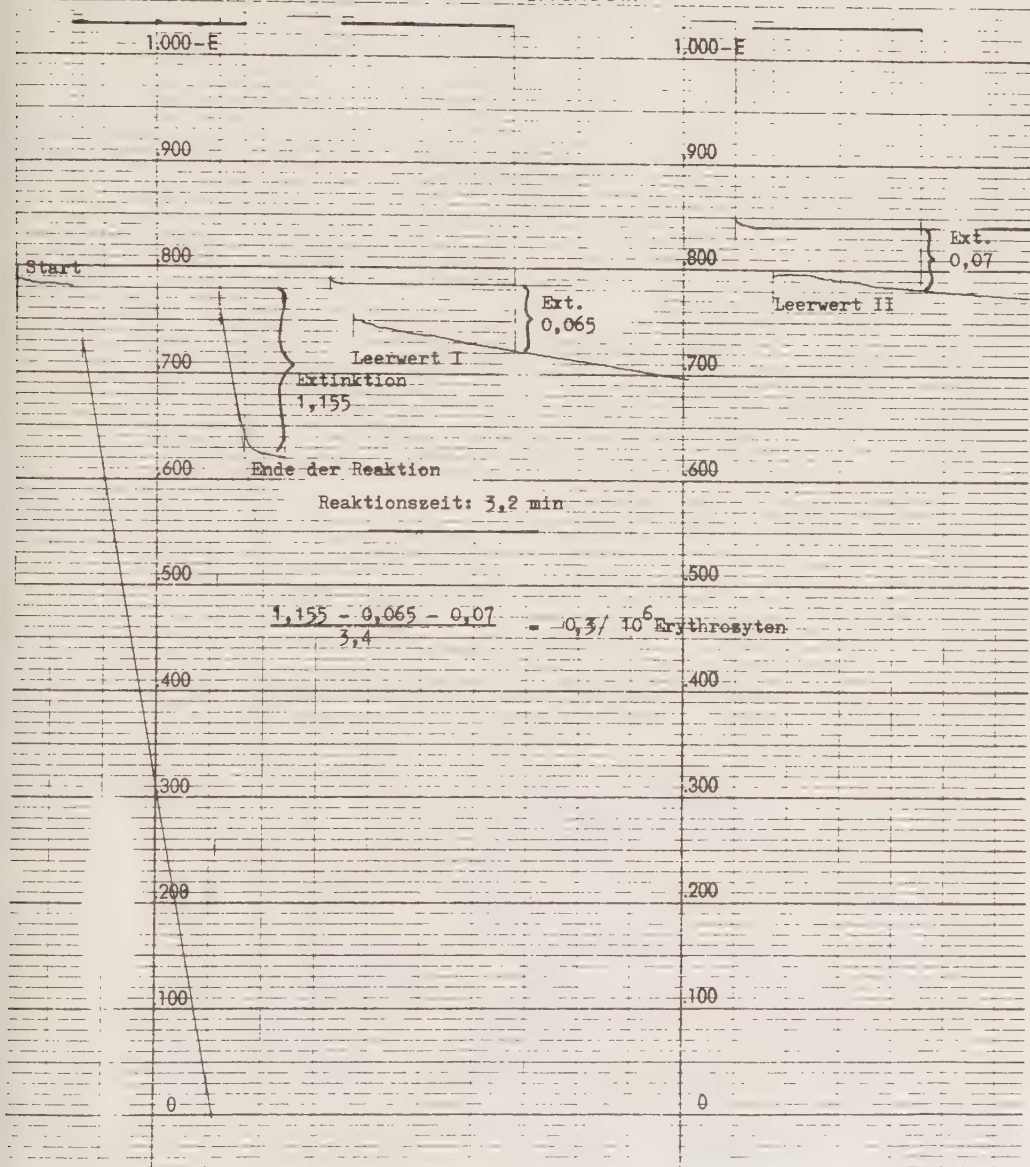
Anlage 1

Protokoll der Enzymaktivitäts-
bestimmung

(Transskriptionsschreiber)

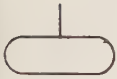
II-Nr. 180 001

EPPENDORF



Anlage 2

Ablaufdiagramm für die Selenbestimmung



Terminal, Start/Stop



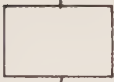
Frage



Seitenverbindung zu nächster Seite



Seitenverbindung von voriger Seite



Vorgang, Handlung



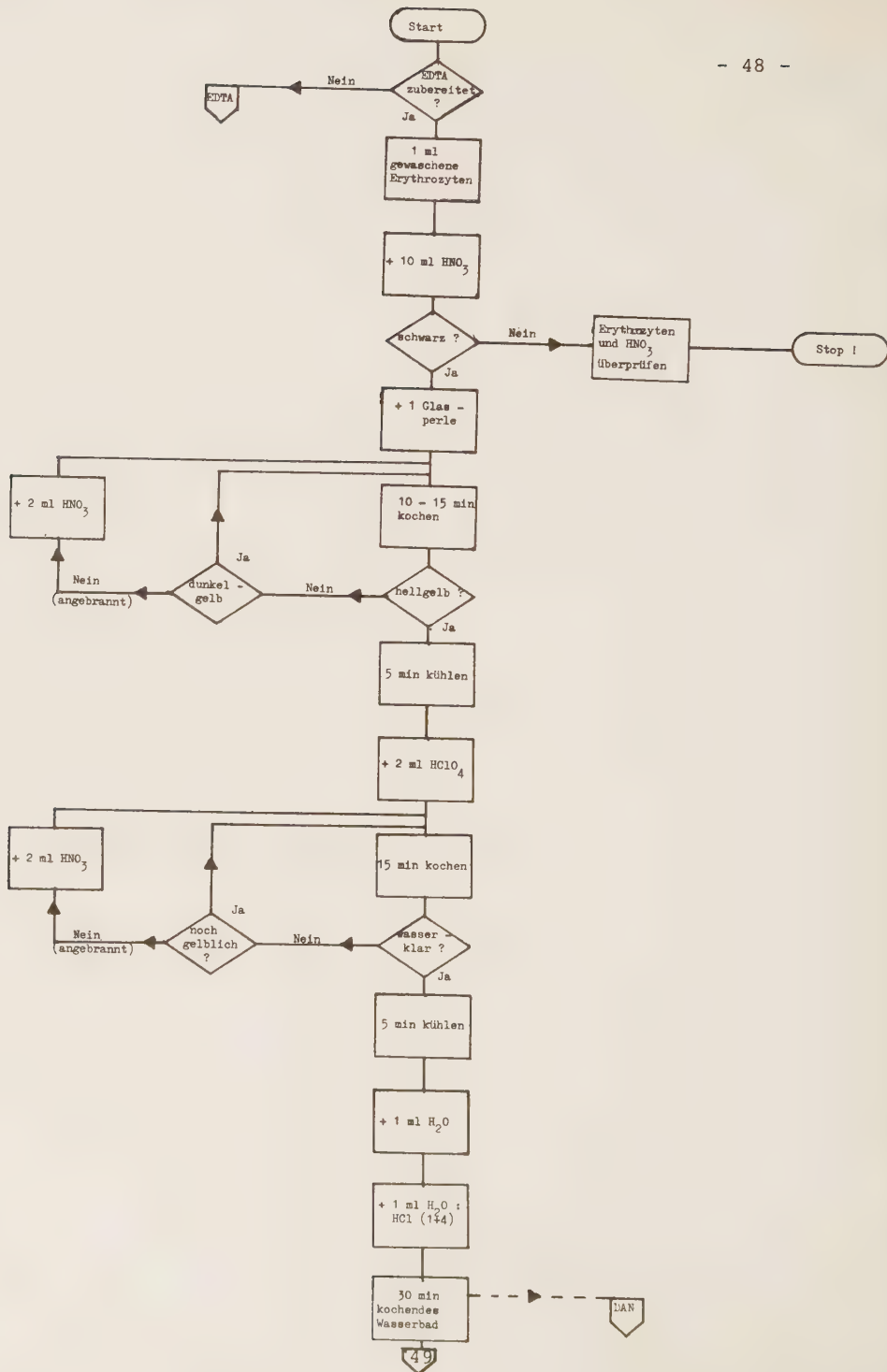
Addition

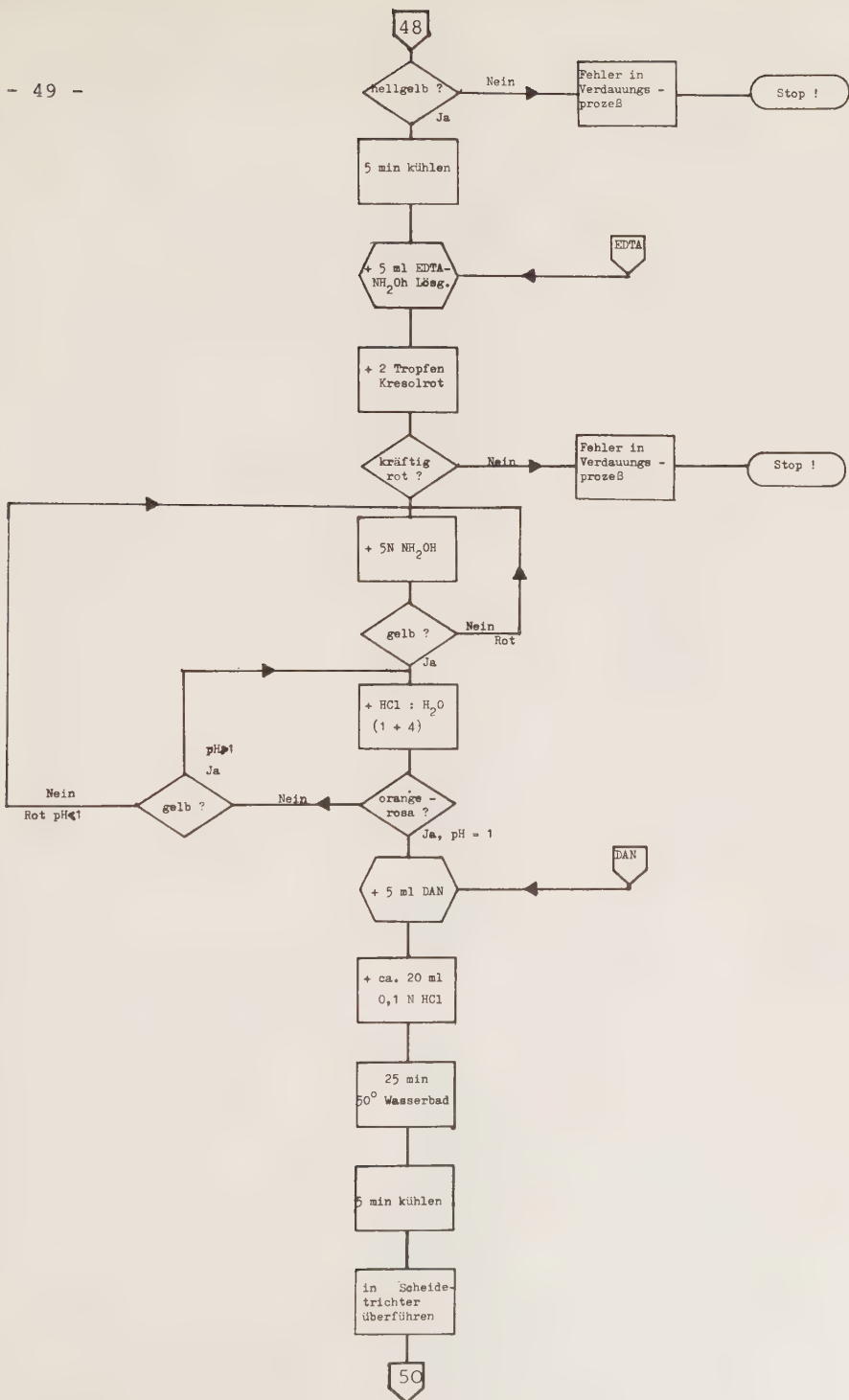


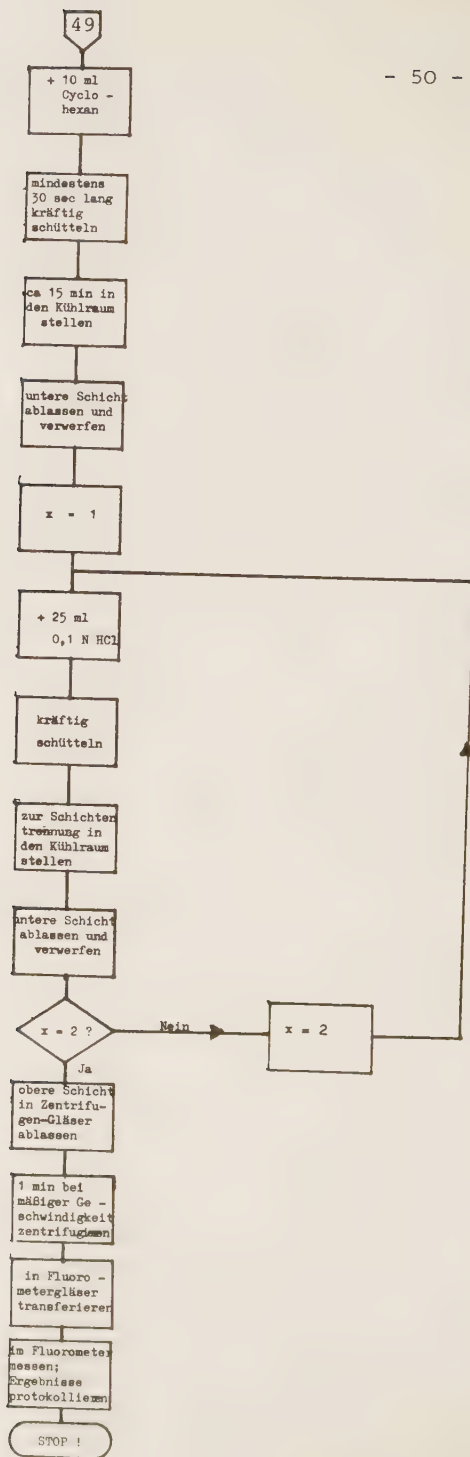
Verlaufsrichtung (durch Pfeile gekennzeichnet, falls nicht senkrecht von oben nach unten)

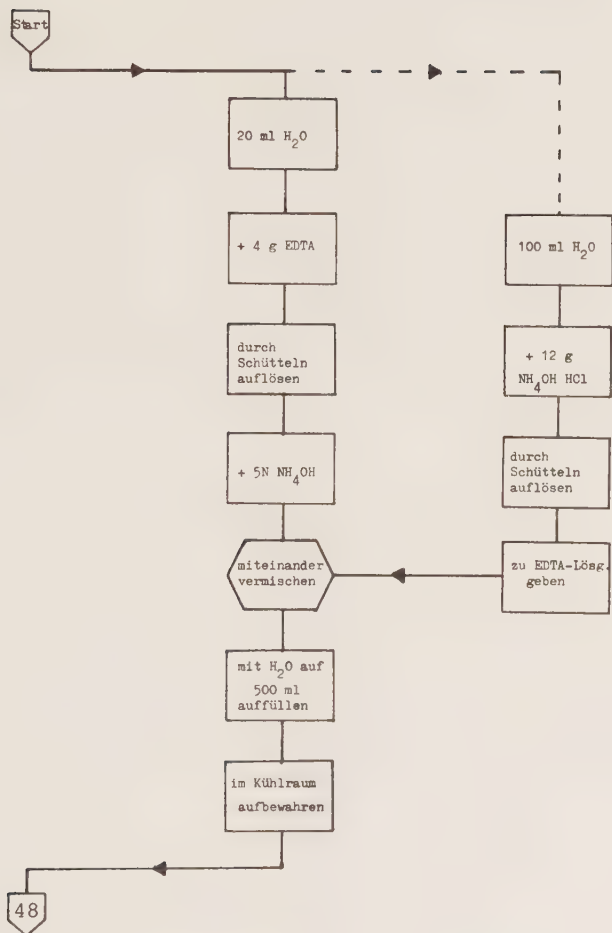


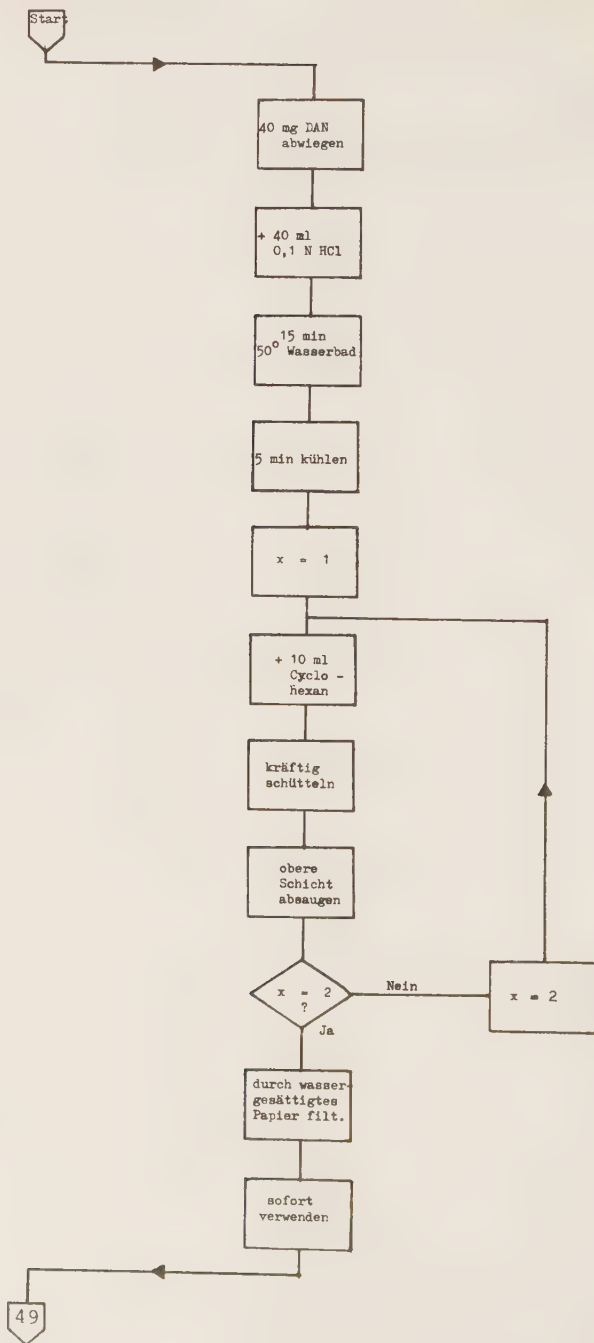
Abhängigkeit











Herrn Priv. Doz. Dr. med. H. J. Böhles danke ich
für die Überlassung des Themas und für seine
freundliche Unterstützung bei der Durchführung
dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. K. Stehr danke ich für
die Möglichkeit, diese Arbeit an der Kinderklinik
Erlangen durchführen zu können.

Lebenslauf

Am 26. August 1954 wurde ich als Tochter des Studiendirektors Dr. Herbert Maas und seiner damaligen Ehefrau Felicitas Stumm, geborene Oehm, geschiedene Maas in Nürnberg geboren. Von 1960-64 besuchte ich die Volksschule in Nürnberg und im Anschluß daran das Labenwolf-Gymnasium daselbst, wo ich im Mai 1973 die Reifeprüfung ablegte.

Die Zeit zwischen Schule und Studium nutzte ich zu einem Auslandsaufenthalt in England. Drei Monate davon verbrachte ich als Schwesternhelferin am Hillingdon Hospital in Middlesex, weitere vier Monate als Übersetzungssekretärin in der Sprachabteilung der Brunel University und vier Monate als Ingenieurassistentin in einem Industriebetrieb in Bedford.

Vor Aufnahme meines Medizinstudiums studierte ich im Sommersemester 1974 Jura an der Universität Tübingen. Seit dem Wintersemester 1974 studiere ich Humanmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen und habe dort im August 1976 die ärztliche Vorprüfung, im August 1977 den ersten, und im August 1979 den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung abgelegt. Nach dem praktischen Jahr (Ausbildungsabschnitte in der Inneren Klinik und Kinderklinik Erlangen und der Chirurgischen Klinik in Nürnberg) schloß ich im Oktober 1980 mit dem dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung das Staatsexamen ab.

Am 20. September 1979 heiratete ich Allan Doyle aus London.

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197